

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Fafíliková

Role PDZ-vazebné domény E6 onkoproteinu v patogenezi vysoce onkogenních papillomavirů

Role of the PDZ Domain-Binding Motif of the Oncoprotein E6 in the Pathogenesis of High
Risk Papillomaviruses

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 8. 2012

Tereza Faflíková

Děkuji RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za rady, připomínky a podporu při vytváření této práce.

Obsah

Seznam užitých zkratk.....	5
Abstrakt.....	7
Klíčová slova.....	7
Abstract	8
Key words	8
1 Úvod.....	9
2 Taxonomie.....	10
3 Patogeneze.....	12
4 Životní cyklus.....	13
4.1 Genom	13
4.2 Proteiny	14
4.2.1 E6.....	14
4.2.2 E7.....	15
5 PDZ doména.....	16
5.1 Interakce PBM E6 s PDZ doménami vybraných buněčných proteinů	19
5.1.1 PBM E6 a hDlg	19
5.1.2 PBM E6 a hScrib	20
5.1.3 PBM E6 a MAGI-1	20
5.1.4 PBM E6 a NHERF-1	21
5.1.5 PBM E6 a CAL	21
5.1.6 PBM E6 a GIPC	22
5.1.7 PBM E6 a PTPN13.....	22
5.1.8 PBM E6 a NF- κ B	22
5.1.9 PBM E6 a Wnt/ β -cateninová dráha.....	23
5.2 Další funkce PBM	23
6 Závěr.....	24
7 Literatura	25

Seznam užitých zkratk

AMK	amino acid	aminokyselina
ATM-ATR	ataxia telangiectasia, mutated – ATM and RAD3-related DNA damage pathway	mutovaná ataxia telangiectasia – ATM a RAD3 příbuzná dráha poškozující DNA
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer	Bcl-2 homologní antagonist/zabiják
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	B-buněčný lymfom 2
bp	base pair	pár bazí
BPV	bovine papillomavirus	bovinní papillomavirus
CaSKI	human cervical carcinoma cell line	buněčná linie lidského nádoru děložního čípku
CAL	CFTR-associated ligand	ligand asociovaný s CFTR
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	cyklin dependentní kináza 2
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	chloridový kanál v plasmatické membráně transportující Cl ⁻ ven z buňky
cIAP-2	cellular inhibitor of apoptosis protein 2	buněčný inhibitor apoptického proteinu 2
Cl⁻	chloride ion	chloridový iont
DHR	Dlg homologous region	Dlg homologní region
Dlg	discs large protein	velký diskový protein
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
E1-7	early viral protein 1 – 7	časný virový protein 1 – 7
E6-AP	E6-associated protein	E6-asociovaný protein
E6BP	E6 binding peptide	peptid vázající se na E6
E6TP1	E6-targeted protein 1	E6-cílový protein 1
E2F	transcription factor E2F	transkripční faktor E2F
eIF4F	eukaryotic initiation factor 4F	eukaryotický iniciační faktor 4F
FA	Fanconi anaemia pathway	dráha Fanconi anaemia
G1-fáze	gap 1 phase	fáze buněčného růstu následující po mitóze
G2-fáze	pre-mitotic phase	2. generační premitotická fáze
GAIP	GTPase-activating protein for Gai subunit	GTPázu aktivující protein pro Gai podjednotku
GIPC	GAIP-interacting protein, C terminus	protein interagující GAIP na C'-konci
hDlg	human homologue of Drosophila tumor suppressor Dlg	lidský homolog tumor supresoru Dlg z Drosophily
HeLa	human cervical carcinoma cell line (named after Henrietta Lacks)	buněčná linie lidského nádoru děložního čípku (pojmenované po Henriettě Lacksové)
HPV	human papillomavirus	lidský papillomavirus
hScrib	human homologue of Drosophila tumor suppressor Scribble	lidský homolog tumor supresoru Scribble z Drosophily
hTERT	human telomere reverse transcriptase	lidská telomerová reverzní transkriptáza
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Mezinárodní výbor pro klasifikaci virů
Id3	inhibitor of DNA binding 3	inhibitor vazby DNA 3

IκB	inhibitor NF-κB	inhibitor NF-κB
kDa	kilodalton	kilodalton
L1-2	late viral protein 1 – 2	pozdní virový protein 1 – 2
LCR	long control region	dlouhá kontrolní oblast
MAGI-1, 2	membrane-associated guanylate kinase 1, 2	membránově asociovaná guanylát kináza 1, 2
MAGUK	membrane-associated guanylate kinases	membránově asociované guanylát kinázy
MHC-I	major histocompatibility complex I	hlavní histokompatibilní komplex I
MTEC	murine tonsil epithelial cells	myší epiteliální buňky mandlí
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	jaderný faktor lehkého řetězce kappa aktivovaných B buněk
NHERF-1	Na ⁺ /H ⁺ exchange regulatory factor 1	regulační faktor Na ⁺ /H ⁺ přenašeče
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
p50-53	protein 50-53	protein 50-53
PBM	PDZ domain-binding motif	PDZ-vazebná doména
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1	PSD-95/Dlg/ZO-1
PSD-93, 95	post-synaptic density protein 93, 95	protein postsynaptické denzity 93, 95
PTPN13	protein tyrosin phosphatase N13	protein tyrozinová fosfatáza N13
pRb1	retinoblastoma protein 1	retinoblastomový protein 1
PV	papillomavirus	papillomavirus
Ras^{V12}	rat sarcoma protein V12	protein krysího sarkomu V12
RelA, RelB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	v-rel retikuloendotelový virový onkogenní homolog
RhoG	ras homolog gene family, member G	příbuzný člen rodiny Ras vázající GTP
S-fáze	synthesis phase	fáze syntézy
SAP 90, 97, 102	synapse-associated protein 90, 97, 102	protein asociovaný se synapsemi 90, 97, 102
SGEF	RhoG-specific guanine nucleotide exchange factor	RhoG-specifický guaninový výměnný faktor
TCF4	T-cell factor 4	faktor T-buněk 4
TGF-β1	tumor growth factor β1	nádorový růstový faktor β1
TNF	tumor necrosis factor	tumor nádorové nekrózy
VLP	virus-like particle	viru podobná částice
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace
Wnt	Wingless/Integration-1 signaling pathway	signální dráha pojmenovaná po mutantě bezkřídle Drosophily
wt	wild-type	divoký typ
ZO-1	zonula occludens protein 1	protein těsného spojení 1

Abstrakt

Infekce některými lidskými papillomaviry (HPV) je spojena s vysokým rizikem karcinomů. U E6 proteinu tzv. vysoce rizikových α -HPV se na úplném C'-konci nachází PDZ-vazebná doména. Touto doménou se E6 váže na buněčné proteiny obsahující PDZ doménu, které se podílejí na udržování buněčné polarity, stabilizaci mezibuněčných spojů nebo regulaci buněčných signálních drah. Mezi tyto interagující buněčné proteiny patří hDlg (lidský homolog *Discs large* proteinu), hScrib (lidský homolog tumor supresoru Scribble), MAGI-1 (membránově asociovaná guanylát cykláza 1) a několik dalších proteinů. Spojení E6 a buněčných proteinů přes PDZ-vazebnou zabraňuje indukci apoptózy a má také vliv na urychlení tempa růstu infikovaných buněk, degradaci buněčných těsných spojů, regulaci buněčné polarity a vezikulárního transportu. Zároveň se zvyšuje i stabilita samotného E6 proteinu, který je prostřednictvím PDZ-vazebné domény chráněn před proteazomální degradací. Působením PDZ-vazebné domény se vysoce rizikové HPV podílejí na rozvoji maligních nádorů.

Klíčová slova

Papillomavirus, E6 protein, PDZ doména

Abstract

The infection by high-risk human papillomaviruses is involved in causing cancers. The extreme carboxy terminus of high-risk α -HPV E6 protein contains a PDZ domain-binding motif. The E6 protein of high-risk HPV binds by PDZ domain-binding motif to cellular proteins containing PDZ domain, which participate in the maintenance of the cell polarity, in the stabilization of cell-cell junctions or in the regulation of cellular signaling pathways, e.g. hDlg (human homologue of Discs large protein), hScrib (human homologue of Drosophila tumor suppressor Scribble). Binding of E6 with cellular proteins prevents the induction of apoptosis and influences the enhancement of growth rate of infected cells, degradation of tight-junctions, regulation of cell polarity and vesicular transport. The interaction between E6 and cellular proteins increases the stability of E6 protein and protects E6 from proteasomal degradation. PDZ domain-binding motif of E6 high-risk HPV contributes to the development of malignant tumors.

Key words

Papillomavirus, E6 protein, PDZ domain

1 Úvod

Papillomavirus je neobalený virus s cirkulárním DNA genomem napadající pouze epidermis. Čeleď *Papillomaviride* čítá přes 200 zástupců napadající především skupiny savců a některých ptáků. U lidí bylo identifikováno přes 120 druhů papillomavirů, které mohou být schopny vyvolat onemocnění, z toho téměř jedna třetina specificky napadá epiteliální buňky genitálního traktu (Bodily a Laimins, 2011). Mezi běžná onemocnění způsobená lidským papillomavirem (HPV) patří bradavice vyskytující se nejčastěji na končetinách, nezhoubná kondylomata (*condylomata accuminata*) na genitáliích a jejich okolí. Někteří zástupci však mají i onkogenní potenciál. Dle studií Muñoze a kolektivu z roku 2003 jsou z nejčastěji se vyskytujících HPV klasifikovány jako vysoce rizikové, typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82. Z vysoce rizikových zástupců, též nazývaných jako vysoce onkogenní HPV, získaných přímo biopsií z nádorů čípku převládá především HPV-16 způsobující různé formy genitálních lézí (zur Hausen, 2002).

Pravidelné statistiky Mezinárodní zdravotní organizace WHO ukazují, že každý rok je celosvětově diagnostikována rakovina děložního čípku u více než půl milionu žen, z toho zhruba polovina žen každý rok na tuto nemoc umírá. U žen ve věku 15 – 44 let je právě rakovina děložního čípku hned po rakovině prsu druhým nejčastějším karcinomem. Mezi ostatní méně časté anogenitální karcinomy způsobené HPV patří anální karcinom, rakovina vulvy, vagíny a penisu. Incidence těchto onemocnění je však nižší než cervikálního karcinomu a vyskytuje se především v rozvojových zemích. V neposlední řadě je 15 – 20 % případů rakovin ústní dutiny a hltanu (vyjma nosohltanu) spojeno s HPV a spekuluje se o zvýšení incidence v posledních letech pravděpodobným přenosem tohoto viru prostřednictvím orálního sexu (WHO/ICO, 2010). V České republice je cervikální karcinom ročně diagnostikován zhruba u 1000 žen. Podle posledních dostupných statistik z roku 2008 bylo v ČR nahlášeno 990 nových případů a úmrtnost byla 389 (WHO/ICO, 2010).

Onkogenní potenciál HPV je spojen s integrací virové DNA do hostitelského chromozomu. Důsledkem integrace virové DNA může být poškození nebo odstranění E2 ORF, což vede k nekontrolovatelné expresi virových genů E6 a E7 (Gaiffe et al., 2012). Jedním z důležitých rozdílů mezi vysoce a málo rizikovými HPV je schopnost transformace buňky prostřednictvím silné interakce mezi E7 a retinoblastomovým tumor supresorovým proteinem pRb a E6 s buněčným proteinem p53 (James et al., 2006). Vysoce rizikové HPV jsou schopny s těmito buněčnými proteiny asociovat s mnohem vyšší efektivitou (Gaston, 2012). Ukazuje se, že jedním z dalších důležitých znaků rozlišujících vysoce a nízko rizikové papillomaviry je přítomnost tzv. PDZ-vazebné domény na C'-konci onkoproteinu E6.

Cílem této práce je podat přehled o roli PDZ-vazebné domény E6 onkoproteinu v životním cyklu vysoce onkogenních HPV. Podrobné studium vazebných preferencí jednotlivých proteinů viru může

vést k pochopení interakcí těchto proteinů s buněčnými, což může mít za následek vývoj nových terapeutických postupů a medikamentů.

2 Taxonomie

Podle mezinárodní organizace ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) jsou papillomaviry (PV) hierarchicky uspořádány do rodů, druhů a typů (Bernard, 2004). PV nevyvolávají silnou protilátkovou odpověď, proto nemohou být klasifikovány na sérotypy. Taxonomie je zde založena na podobnosti nukleotidové sekvence genu pro pozdní protein L1 kódujícího hlavní kapsidový protein (de Villers et al., 2004). Vykazuje-li virus minimálně 10% rozdílnost v L1 genu, pak je charakterizován jako jiný typ. Ve větším měřítku pak může mnoho typů v rámci rodu vykazovat méně než 60 % genetické shody v L1 genu (Bernard et al., 2010).

V rodině *Papillomaviridae* existuje 30 různých fylogenetických rodů pojmenovaných řeckými písmeny. Protože samotná řecká abeceda má pouze 24 písmen, používají se pro nové rody písmena řecké abecedy s předponou *dyo*, což znamená v řečtině podruhé (Bernard et al., 2010). Pět z těchto rodů se skládá výhradně z lidských a opičích papillomavirů (α , β , γ , μ a ν), ostatní rody pocházejí z jiných savců a některých ptáků.

3 Patogeneze

Klinicky nejdůležitějším rodem jsou α -papillomaviry, které vyvolávají u lidí slizniční a genitální léze (Bernard, 2004). Rod β -papillomavirů způsobuje u imunokompetentních jedinců převážně asymptomatické kožní infekce a u imunosuprimovaných jedinců viditelné kožní léze. Na rozdíl od ostatních rodů HPV nesnižují β -HPV počet Langerhansových buněk v organismu hostitele. Langerhansovy buňky jsou v pokožce jedinými primárními antigen-prezentujícími buňkami, které jsou schopny rozpoznat HPV antigen. Redukcí těchto dendritických buněk si kožní i slizniční α , γ a μ HPV vytvářejí v epidermis permisivní prostředí pro virovou persistenci (Leong et al., 2010). Zástupci γ -HPV způsobují kožní léze a jsou histologicky rozpoznatelné díky inkluzním tělískům v cytoplazmě (de Villers et al., 2004).

HPV patří mezi nejčastější sexuálně přenosné infekce a více než 42,5 % amerických žen je v průběhu života infikováno některým typem HPV (Hariri et al., 2011). Většina infekcí probíhá asymptomaticky a infekce odezní v průběhu 1 – 2 let. V některých případech však může dojít k ustavení perzistentní infekce trvající řadu let. Perzistentní infekce většinou HPV se klinicky projevují jako lokální kožní léze a benigní bradavice. HPV 5 a 8 se mohou podílet na vzniku Epidermodysplasia verruciformis, což je mimořádně vzácné onemocnění kůže. Perzistentní infekce některých typů HPV označovaných jako vysoce rizikové může vést ke vzniku nádorů (Tabulka 1). Pro nádory vzniklé v důsledku infekce vysoce rizikovými HPV je charakteristický nález integrovaného virového genomu v hostitelské chromozomální DNA (Wentzensen et al., 2004). Při integraci většinou dojde k přerušení ORF pro regulační protein E2. Jeho nefunkčnost vede k deregulaci exprese virových onkoproteinů E6 a E7 (Gaiffe et al., 2012). E6 a E7 proteiny jsou schopny inaktivovat buněčné onkosupresory p53 a pRb a deregulovat řadu buněčných procesů, u vysoce rizikových HPV však s mnohem větší efektivitou než u nízkorizikových HPV. V bovinním papillomaviru BPV1 je E5 ORF hlavní transformující virový protein, u některých HPV může přerušení v E5 expresi narušit jejich životní cyklus (Münger et al., 2004).

Typy papillomavirů v genitálních lézích

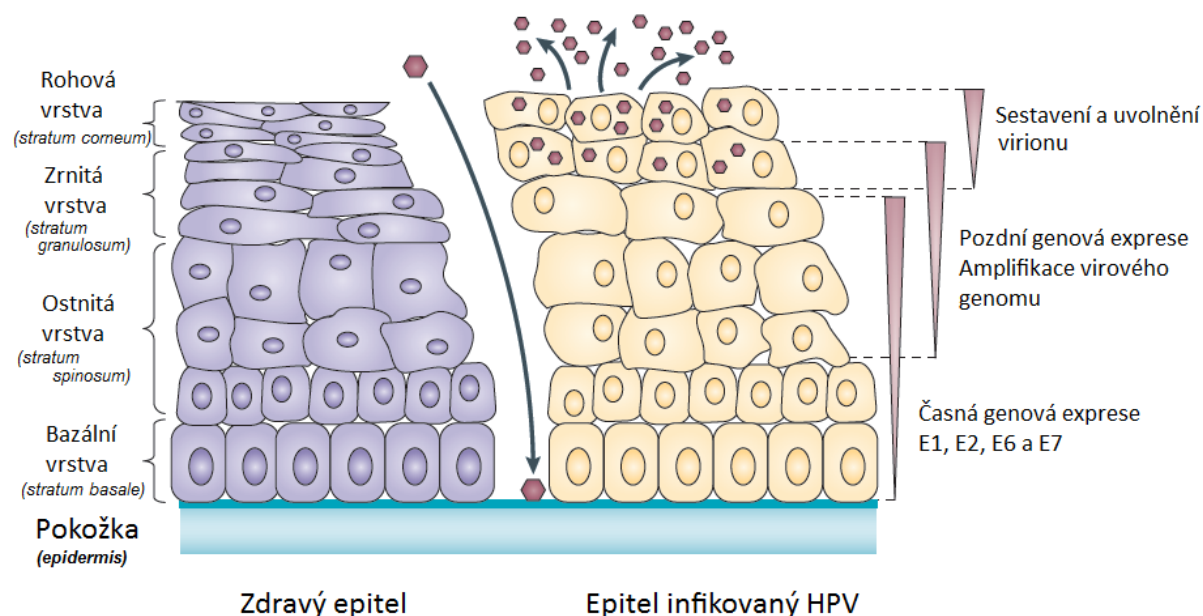
Typy genitálních lézí	Typ HPV	
	Menší výskyt	Převažující výskyt
Genitální bradavice (<i>condylomata acuminata</i>)	42,44,51,53,83	6,11
Prekanceróza (<i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)	6,11,18,26,30,31,33,34,35,39,40,42,43, 45,51,52,53,54,55,56,57,58,59,61,62,64, 66,67,68,69,70,71,73,74,79,81,82,83,84	16
Rakovina děložního hrdla a jiné anogenitální karcinomy	(6,11),18,31,33,35,39,45,51,52,54,56, 58,59,66,68,69	16

Lidské papillomaviry (HPV) uvedené v závorkách se vzácně vyskytují ve větší míře.

Tabulka 1: Shrnutí výskytu různých typů vysoce rizikových lidských papillomavirů (HPV) v nejčastěji se vyskytujících sexuálně přenosných onemocněních. U genitálních bradavic převažují typy HPV 6 a 11, které se mohou nacházet i v nádorově transformovaných buňkách děložního čípku. Největší mírou se na vzniku anogenitálních karcinomů a prekanceróz podílí typ HPV 16. Převzato z zur Hausen (2002).

4 Životní cyklus

Životní cyklus viru je úzce spojen s cyklem hostitelské buňky. Vniknutím do poškozeného dlaždicového epitelu se virus dostane do bazální vrstvy, kde se udržuje v nízkém počtu kopií v podobě tzv. epizomální virové DNA. Diferenciace HPV pozitivních buněk indukují produktivní fázi virového životního cyklu a pomocí hostitelského replikačního aparátu vytváří virové potomstvo. Právě expresí E6 a E7 virus ovlivní hostitelský cyklus a tlačí buňku do S-fáze, která umožní amplifikaci virové DNA. Existuje několik způsobů, kterými onkoprotein E7 udržuje vysokou aktivitu buněčné CDK2, která je důležitá pro přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu (Moody a Laimins, 2010). E6 onkoprotein degraduje tumor supresor p53, který směřuje při poškození DNA buňku k apoptóze. V terminálních diferencovaných buňkách se již virus replikuje ve velkém počtu kopií a jsou exprimovány pozdní geny sloužící k enkapsidaci virového genomu. Pomocí E4 proteinu, který působí na mechanickou stabilitu keratinových intermediálních vláken, jsou viriony z těchto buněk uvolňovány do okolí (Münger et al., 2004).



Obrázek 2: Levá část obrázku popisuje jednotlivé vrstvy pokožky ve zdravé tkáni, vpravo je schematicky znázorněn životní cyklus lidského papillomaviru (HPV) v infikovaném epitelu. HPV se přes poranění v kůži dostává do buněk bazální vrstvy epidermis a dochází k expresi časných virových proteinů. V nediferencovaných buňkách je životní cyklus viru spjat s životním cyklem hostitelské buňky. Při buněčném dělení, kdy se dceřiná buňka vzdaluje od bazální vrstvy a dostává se blíže k rohové vrstvě pokožky, se nastartuje produkce virového potomstva, ke které virus využívá hostitelský replikační aparát. Aby se HPV pomnožil, tlačí hostitelskou buňku pomocí E6 a E7 do S-fáze. Ve svrchních vrstvách pokožky jsou viriony (červené šestiúhelníky) sestavovány a opouštějí hostitele. Převzato z Moody a Laimins, 2010.

4.1 Genom

Genom HPV je složen z cirkulární dvouřetězcové DNA o velikosti ca. 8000 bp, ale aktivně transkribován je pouze jeden řetězec. V hostitelské buňce se vyskytují ve formě epizomů, které se replikují nezávisle na replikačním cyklu hostitelské infikované buňky. Genom viru je rozdělen na 3 části: region kódující časně geny (*Early region*), pozdní geny (*Late region*) a regulační oblast zvaná *long control region* (LCR), která reguluje úroveň exprese těchto genů a je z velké části zodpovědná za

tkáňovou specificitu jednotlivých PV typů. Časná oblast obsahuje 6 běžných ORF (E1, E2, E4, E5, E6, E7) a teoreticky jsou zde anotovány i ORF E3a E8. Pozdní oblast obsahuje dva ORF (L1 a L2).

4.2 Proteiny

Virová exprese je ve většině případů spojena s expresí 6 nestrukturních proteinů (E1, E2, E4, E5, E6, E7). E1 a E2 kódují časně produkty zodpovědné za regulaci replikace a transkripce. Nezbytným krokem zahájení virové replikace je asociace E2 proteinu s virovou DNA helikázou E1 (Münger et al., 2004). E5, E6 a E7 kódují genové produkty stimulující buněčnou proliferaci a regulují diferenciaci keratinocytů. Právě pro jejich schopnost zasáhnout do buněčného cyklu hostitele jsou tyto 3 genové produkty nazývány onkoproteiny. Proteiny E4 a E5 jsou exprimovány jak v časně, tak i v pozdní fázi infekce. E4 protein je důležitý pro správné sestavení virionových částic a jejich uvolnění z hostitelské buňky pomocí remodelace cytokeratinu. E5 je hydrofobní membránový protein, který se podílí na úniku slizničních papillomavirů před imunitním systémem. Je také hlavním onkoproteinem bovinního papillomaviru, který se nachází v membránových kompartmentech buňky (v plazmatické membráně, endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu). Tam se váže na buněčné tyrosin-kinázy, inhibuje biosyntézu MHC-I (z anglického *major histocompatibility complex – I*), případně spolupracuje i s ostatními virovými onkoproteiny (Venuti et al., 2011). L1 protein je majoritní kapsidový protein, který je schopný se sám sestavit do tzv. VLP (*virus like particle*) a je důležitý pro vazbu viru na receptor hostitelské buňky (Gaston, 2012). L2 je minoritní protein virové kapsidy, který svou přítomností zvyšuje infekčnost daného HPV a pevnost virové kapsidy (Holmgren et al., 2005). Všechny známé PV obsahují funkční geny E1, E2 a strukturní geny L1 a L2. E5 se u β a γ HPV nevyskytuje. E8 protein se podařilo detekovat u BPV-4 (O'Brien et al., 1998), HPV-31 (Stubenrauch et al., 2000) a králičích papillomavirů (Harry a Wettstein, 1996). Většina běžných PV má onkoprotein E7, ale někteří zástupci, jako např. HPV 101 nebo 103, postrádají E6 (Gaston, 2012; Chen et al., 2007).

4.2.1 E6

Onkoprotein E6 má podle typu PV velikost 15 – 20 kDa. Proteiny, které se váží na E6, mají amfipaticky záporně nabitý peptid se sekvencí LXXLL uspořádaný do alfa helixu, který se váže přímo do žlábků v E6. Mezi takovými proteiny patří i E6-AP (*E6-associated protein*), což je buněčná proteinová ubiquitin ligáza a na jejím množství je přímo závislá i exprese E6 (Gaston, 2012). Prostřednictvím E6-AP je onkoprotein E6 schopen zprostředkovat proteazomální degradaci několika buněčných proteinů, např. p53, Bak, E6BP, E6TP1,Dlg, MAGI-1, MAGI-2 aj. (Pim et al., 2009). Právě proto, že může interagovat s mnoha proteiny klíčovými pro kontrolu buněčných pochodů, je schopen E6 ovlivňovat řadu vnitrobuněčných procesů zároveň. Nejznámější funkcí E6 je degradace p53, což je 53 kDa velký buněčný protein, který kontroluje růst buněk, opravu DNA nebo apoptózu. Pro degradaci p53 je potřeba vytvořit komplex mezi p53, E6 a E6-AP a ten je poté naváděn do

proteazomu (James et al., 2006). Neméně důležitou funkcí E6 onkoproteinu je také aktivace buněčné telomerové reverzní transkriptázy (hTERT). Tento enzym je aktivní při časně embryogenezi buněk, u dospělého jedince je pak funkce enzymu zachována pouze v kmenových buňkách a v progenitorových buňkách somatické tkáně, která je schopna se sama obnovovat. Bylo však zjištěno, že je jeho exprese také spojena s 85 % maligních nádorů (Zhu et al., 2010).

Bylo vypořádováno několik rozdílů v E6 mezi vysoce a nízkou rizikovými HPV. Jedním z rozdílů je síla vazby E6 na buněčný protein Bak, který patří do proteinové rodiny Bcl-2 zapojující se do reakce apoptózy. E6 málo rizikových HPV je schopen se vázat na Bak pouze s velmi nízkou afinitou, naopak E6 vysoce rizikové HPV se váže silněji. Dalším rozdílem je transkripční schopnost aktivace katalytické podjednotky telomerázového komplexu zvané hTERT (Oh et al., 2001). Touto cestou mohou vysoce rizikové HPV immortalizovat lidské keratinocyty a utvářet tak vhodné prostředí pro budoucí nádorovou buňku. Dále se vysoce rizikové a málo rizikové slizniční HPV liší expresí E6 a E7. U nízkou rizikových HPV je E6 a E7 exprimován každý z jiného transkripčního počátku, zatímco u vysoce rizikových HPV jsou transkribovány z jednoho společného promotoru. Důležitým rozdílem mezi málo rizikovými a vysoce onkogenními HPV je přítomnost PDZ-vazebné domény na C'-konci E6 onkoproteinu. Právě přítomnost této sekvence a schopnost vázat se do PDZ domény se spolupodílí na patogenezi nádorů vyvolávajících HPV (Pim a Banks, 2010).

4.2.2 E7

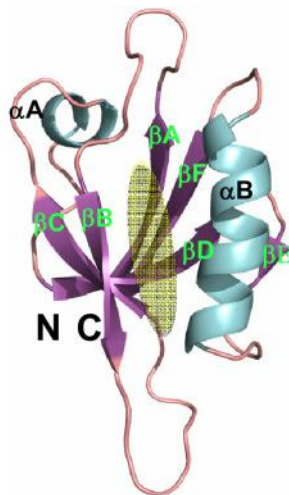
E7 protein obsahuje peptidovou sekvenci LXCXE, kterou se váže na členy retinoblastomové proteinové rodiny a směřuje pRb k degradaci. Zatímco ve vysoce rizikových HPV, které způsobují anogenitální rakovinu, je E7 sám o sobě onkogenní, u HPV, které nevyvolávají rakovinu, je E7 málo onkogenní a buď vykazuje sám malou onkogenní aktivitu, nebo potřebuje spolupracovat s jinými onkogeny (Gaston, 2012). E7 se váže na retinoblastomový tumor supresor (RB) a je schopen ho i inaktivovat. Protein RB (pRb) kontroluje buněčný cyklus navázáním na transkripční faktor E2F a E7 je schopen tento komplex rozdělit a tím obejít kontrolní body v G1-S fázi. Aby byl virus schopen čelit buněčným obranným mechanismům jako je apoptóza, pomáhá si interakcí E6 s tumor supresorem p53 (White et al., 2011).

Důležitým krokem k navození maligního vývoje hostitelské buňky je indukce chromozomální nestability vysoce rizikovými HPV. Samotný E7 je schopný zvýšit počet centrozomů v jádře, ovšem v buňkách, které exprimují E6 i E7 zároveň, se tento jev vyskytuje hojněji (Duensing et al., 2000). Tato amplifikace centrozomů je závislá na vysoké úrovni aktivity CDK2 (cyklin-dependentní kináza 2) prostřednictvím degradace pRb onkoproteinem E7 a také na spolupráci E6 a E7 v inhibici apoptózy (Duensing et al., 2006; Moody a Laimins, 2010; Korzeniewski et al., 2011). E7 spolu s E6 také indukuje poškození DNA a častější integraci neznámé DNA do hostitelského chromozomu (Kessis et al., 1996). Pro úspěšnou virovou replikaci je nutná aktivace ATM-ATR dráhy (z anglického

ataxia telangiectasia, mutated – ATM and RAD3-related DNA damage pathway), která startuje buněčné opravné mechanismy indukci kontrolních bodů buněčného cyklu v S fázi a mezi G2 a mitotickou fází. E7 může tyto kontrolní body zrušit a tím podpoří vstup buňky do mitózy. Aktivace tohoto opravného mechanismu buněčné DNA se zdá být důležitá pro maligní vývoj buňky a amplifikaci viru. E7 protein HPV-16 aktivuje za normálních podmínek také FA dráhu (Fanconi anaemia), která podporuje opravu poškozené DNA způsobené během replikace. Avšak v buňkách, které tuto FA dráhu neaktivují, je zvýšené riziko chromozomální nestability způsobené expresí E7 (Spardy et al., 2007; Moody a Laimins, 2010).

5 PDZ doména

PDZ doména je proteinová strukturní doména, která je nazvána podle prvních písmen proteinů, ve kterých byla poprvé identifikována. Jsou to *postsynaptic density protein* (PSD-95), *discs large tumor suppressor* (Dlg) a epiteliální protein těsného spojení mezi buňkami ZO-1. PDZ domény jsou také známy jako *Discs-large homology regions* (DHRs) nebo GLGF pojmenované podle konzervované sekvence Gly-Leu-Gly-Phe v rámci domény. Skládají se z 80 až 100 aminokyselin a jsou tvořeny 6 β -barely ($\beta A - \beta F$) a 2 α -helixy (αA a αB) složenými do šesti-vláknového β sendviče (obrázek 3).



Obrázek 3: Struktura PDZ domény, která je tvořena 6 β -barely ($\beta A - \beta F$), na obrázku fialové barvy, a 2 α -helixy (αA a αB), na obrázku zakresleny světle modrou barvou. Do prostoru mezi βB -barel a αB -helix znázorněného zelenou texturou se váží ligandy obsahující PDZ-vazebnou doménu svým C'-koncem. Převzato z Lee a Zheng, 2010.

PDZ domény jsou součástí membránových a cytoplazmatických proteinů, které jsou schopny shlukovat a lokalizovat proteiny na plasmatické membráně, čímž se angažují v údržbě mezibuněčných těsných spojení, buněčné polarity pomocí iontového transportu a signálních drah (Jeleň et al., 2003). Váže se na specifickou peptidovou sekvenci karboxylového konce cílových proteinů nebo na jinou PDZ doménu v rámci svých interakčních partnerů (James et al., 2006). Tyto ligandy, které jsou schopny interagovat s PDZ doménou, nesou na svém C'-konci okrsek nazývaný PDZ-vazebná doména (z anglického *PDZ domain-binding motif*, zkráceně PBM) a váží se do žlábků mezi βB vlákno a αB helix (Jeleň et al., 2003) pomocí velmi konzervované smyčky umístěné před βB vláknem a sestavené

z aminokyselin R/K-XXX-G- Φ -G- Φ , kde Φ je hydrofobní a X jakýkoliv libovolný aminokyselinový zbytek (Lee a Zheng, 2010).

Existují 3 různé typy PBM. Základním kritériem pro jejich rozdělení do skupin je interakce prvního zbytku α B1 helixu PDZ domény s postranním řetězcem aminokyseliny na druhé pozici C'-konce ligandu (PBM). Podle karboxylového konce se rozdělují PBM do 3 kategorií (viz tabulka 2): C'-konec PBM 1. typu je zakončen sekvencí (-X-S/T-X- Φ_{COOH}), kde se postranní řetězec hydroxylové skupiny serinu nebo treoninu (S/T) váže vodíkovým můstkem na N₃ dusík histidinu v α B1 helixu PDZ domény. 2. typ je zakončen sekvencí (-X- Φ -X- Φ_{COOH}), kde Φ je libovolná hydrofobní aminokyselina a 3. typ obsahuje (-X-D/E-X- Φ_{COOH}) sekvenci, kde X je jakákoliv nespecifikovaná aminokyselina a D/E je buď záporně nabitá kyselina asparagová, nebo glutamová (Hung a Sheng, 2002).

Velké množství PDZ domén obsahuje jakousi prodlužující sekvenci přímo před nebo za kanonickou částí domény. Tato prodloužení mají vliv na sbalování, stabilitu, dynamiku a funkci domén, ke kterým jsou připojena. Hlavními funkcemi jsou zejména změna vazebné afinity, poskytnutí vazebných míst pro makromolekuly, ucelení struktury domény a zvětšení prostoru vazebného místa pro ligandy (Wang et al., 2010). Existují také ligandy, které jsou schopny se navázat na PDZ domény svou interní sekvencí. Je to způsobeno tím, že se ve vazebné části nachází neobvyklá stabilní sekundární struktura, která může být shodná s C'-koncem běžného vazebného ligandu. Díky tomu se mohou napojit do žlábků a interagovat s nimi. (Jeleň et al., 2003).

Třída	C'-konec PBM	Protein obsahující PBM	Příklad proteinu interagujícího s PBM
I. třída -X-[S/T]-X-Φ	-ETDV -ESDV -TTRV -TSVF -ESLV -QSAV -DSSL -DTRL -QTRL -SSTL -PTRL -ETQV -ETQL	- K ⁺ kanál typu <i>shaker</i> - podjednotka NR2A/B receptoru NMDA - neuroligin - ILR-5α - PMCA4b - napětím ovládaný Na ⁺ kanál - protein kináza C-α - β ₂ -adrenergní receptor - CFTR - GKAP - podjednotka mGluR5 metabotropního glutamátového receptoru GRK6A - E6 HPV 18 - E6 HPV 16	- PSD-95 (PDZ2) - PSD-95 (PDZ2) - PSD-95 (PDZ3) - syntenin (PDZ1, PDZ2) - PSD-95 (PDZ1, 2 i 3) - synthropin - PICK1 - NHERF (PDZ1) - NHERF (PDZ1) - Shank/ProSAP - Shank/ProSAP - rodina MAGUK proteinů -rodina MAGUK proteinů
II. třída -X-Φ-X-Φ	-SVKI -EYFI -EYYV -EFYA -YYKV -DVPV	- GluR2 podjednotka AMPA receptoru - glykoforin C - neurexin - syndecan-2 - efrin B1 - receptor skupiny tyrozinových kináz ErbB2	- PICK2, GRIP (PDZ5) - erytrocyt p55 - CASK - CASK, syntenin (PDZ2) - PICK1, Grip (PDZ6), syntenin (PDZ2) - erbin
III. třída -X-[D/E/K/R]-X-Φ	-VDSV -GEPL -FEEL -K/RVYV	- melatoninový receptor - KIF17 - merlin - syntetizovaný peptid	- nNOS - mLIN10/Mint1/X11 - syntenin (PDZ1) - navržený AF6
Ostatní -X-X-C -X-Ψ-[D/E]	-DHWC -YXC	- Ca ²⁺ kanál N-typu - L6 antigen	- Mint1 - SITAC

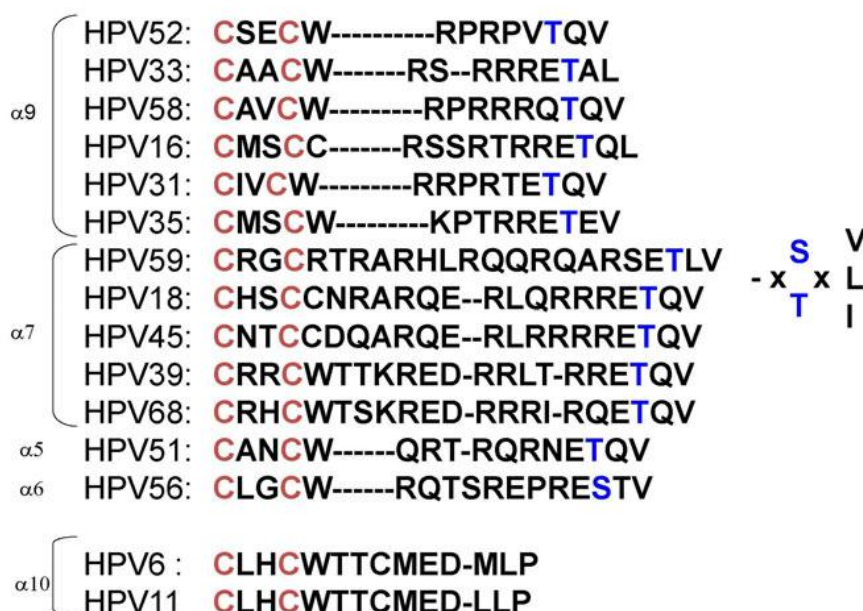
(Φ – hydrofobní AMK, X – nespecifická AMK)

Tabulka 2: Rozdělení vybraných PDZ-vazebných domén (PBM) do tříd podle aminokyselin (AMK) vyskytujících se na C'-konci vazebného ligandu. Zvýrazněné PMB pocházejí z E6 divokého typu (*wild-type*, zkráceně *wt*) HPV18 (-ETQV) a z E6 *wt*-HPV16 (-ETQL). Převzato z Jeleń et al. (2003) a Glaunsinger et al. (2000).

5.1 Interakce PBM E6 s PDZ doménami vybraných buněčných proteinů

E6 onkoprotein má v hostitelské buňce mnoho vazebných partnerů. Jsou to hlavně proteiny obsahující signální molekuly a nacházející se především v buněčných spojích a synapsích, účastníci se udržování buněčné polarity, signalizace v jaderném transportu nebo polymerizace a depolymerizace aktinu při migraci buněk.

PBM sekvence se nachází na onkoproteinech E6 pouze u vysoce rizikových α -HPV (Kiyono et al., 1997), ostatní rody HPV ji nemají (Lazić et al., 2012). Tyto E6 proteiny mají na svém C'-konci PBM sekvenci 1. typu, která váže PDZ doménu a zprostředkovává s ní interakci. U E6 HPV-16 je C'-konec zakončen aminokyselinovou sekvencí $-ETQL_{COOH}$ a u HPV-18 sekvencí $-ETQV_{COOH}$ (Javier a Rice, 2011). Pro porovnání, C'-konec E6 HPV-11, který spadá do kategorie málo rizikových HPV, obsahuje sekvenci $-DLLP_{COOH}$, (viz obrázek 4) která neodpovídá aminokyselinovým požadavkům na PBM (Glaunsinger et al., 2000).



Obrázek 4: Aminokyselinové sekvence PDZ-vazebných konců (PBM) E6 proteinů zástupců vysoce rizikových HPV. Čtyř-aminokyselinová sekvence v pravé části obrázku je odvozena ze všech známých PBM vysoce rizikových HPV a odpovídá aminokyselinovým požadavkům pro PBM I. třídy. Pro porovnání jsou zde uvedeny i genomy C'-konců nízko rizikových zástupců HPV-6 a HPV-11, které PBM neobsahují. Převzato z Pim et al., 2012.

5.1.1 PBM E6 a hDlg

Prvním objeveným buněčným proteinem vázajícím E6 vysoce rizikových HPV prostřednictvím své PDZ domény, byl lidský homolog tumor supresorového proteinu Dlg (*Discs Large Tumor Suppressor*) octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) hDlg (Kiyono et al., 1997). hDlg patří do proteinové rodiny MAGUK (*Membrane-Associated Guanylate Kinase Family*), jejíž hlavní funkcí je správné umístění membránových a cytosolických proteinů mezibuněčných spojů. Existují 4 lidské homology velice příbuzné Dlg. Jsou to Dlg1 (hDlg, SAP97), Dlg2 (PSD93), Dlg3 (SAP102) a Dlg4 (PSD95,

SAP90). Dlg1 a Dlg4 mají 3 PDZ domény, kterými interagují se svými buněčnými protějšky. Tyto Dlg proteiny jsou exprimovány v polarizovaných buňkách, především v proteinech PSD (z anglického *Post-synaptic density protein*) (Handa et al., 2007). hDlg se nacházejí v buňce převážně na periferii a v místech mezibuněčných kontaktů. Za určitých podmínek se mohou nacházet ve velmi omezeném množství i v buněčném jádře, např. jako negativní regulátor buněčného růstu. V buňkách infikovaných HPV byla prokázána degradace fosforylovaných hDlg v jádře a hDlg vyskytujících se v cytoplasmě, zatímco hDlg proteiny vázané v membráně nebyly PBM E6 ovlivněny (Massimi et al., 2004; Narayan et al., 2009). Ztráta exprese hDlg je pozorována až během pozdních fází rakoviny děložního čípku, v prekancerózních stádiích je však určitá úroveň exprese hDlg zachována. Tyto hDlg jsou schopny interagovat s SGEF, který hraje důležitou roli v mezibuněčných kontaktech a buněčné migraci, a prostřednictvím vazby PBM E6 a PDZ domény hDlg utvořit komplex. Díky tomuto komplexu na sebe působí hDlg spolu s SGEF, což má za následek zvýšení aktivity RhoG a tím zvýšení invazivního potenciálu infikované buňky (Subbaiah et al., 2012).

5.1.2 PBM E6 a hScrib

Mezi další PDZ proteiny, které jsou cílem komplexu E6 onkoproteinu s E6-AP je lidský homolog tumor supresoru Scribble (hScrib), který byl objeven původně u *Drosophila melanogaster*. Tento protein obsahuje 4 PDZ domény a nachází se v cytoplasmě, v mezibuněčných těsných spojkách a v jiných membránových strukturách epitelálních buněk (Nakagawa a Huibregtse, 2000; Dow et al., 2003). PBM E6 vysoce rizikových HPV se váže na PDZ doménu 3 hScrib a spolu s E6-AP vytváří komplex, který cílí hScrib k proteazomální degradaci a tím dochází k poškození těsných spojků (Nakagawa a Huibregtse, 2000; Thomas et al., 2005). Výsledky studie Thomase a kolektivu (2005) naznačují, že se E6 HPV-16 pomocí své aminokyselinové sekvence PBM váže na protein hScrib s větší afinitou než HPV-18 a je efektivnější v degradaci tohoto buněčného proteinu. Právě hDlg a hScrib jsou pravděpodobně dva nejdůležitější buněčné proteiny, které se ztrátou své exprese nebo poškozením podílejí na zhoubnosti nádorů způsobené HPV (Pim et al., 2012).

5.1.3 PBM E6 a MAGI-1

MAGI-1 je protein patřící do proteinové rodiny MAGUK. MAGI-1 má na své C'-koncové části umístěných 5 PDZ domén. PBM E6 vysoce rizikových HPV-16 a HPV-18 se váže na PDZ doménu MAGI-1 a navádí tento protein k degradaci. Bylo experimentálně zjištěno, že výměnou některé aminokyseliny z původního PBM vysoce rizikových HPV-16 a HPV-18 ztrácí E6 protein schopnost vázat se na PDZ doménu MAGI-1 a tím ho degradovat (Glaunsinger et al., 2000). Degradace MAGI-1 hraje důležitou roli v onkogenezi způsobenou vysoce rizikovými HPV. S úbytkem MAGI-1 v buněčných liniích HeLa a CaSKi pocházejících z nádorů děložního čípku dochází k poškození buněčných těsných spojků, které zabraňují většině látek procházet mezi sousedními buňkami. Tímto způsobem mohou HPV deregulovat vnitřní prostředí hostitelské buňky. Bylo však experimentálně

prokázáno, že zastavením exprese virových E6 a E7 proteinů a jejich odstraněním mohou být těsné spoje obnoveny (Kranjec a Banks, 2011).

V této souvislosti je zajímavé, že i HPV 70, zástupce nízko rizikových HPV bez E6 PBM se může vázat na proteiny hDlg a MAGI-1 a degradovat je. Na druhé straně HPV-66, který se řadí mezi vysoce rizikové HPV, se neváže na hDlg, hScrib ani MAGI-1 a nenavozuje jejich degradaci (Muench et al., 2009).

5.1.4 PBM E6 a NHERF-1

Dalším proteinem, který obsahuje PDZ doménu a podílí se na klíčových buněčných pochodech je regulační faktor Na^+/H^+ přenašeče – 1 (*Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor – 1*). NHERF-1 má na N⁺-konci 2 PDZ domény, kterými se váže na některé důležité buněčné proteiny a ovlivňuje tím jejich aktivitu (Lee a Zheng, 2010). Na C⁺-konci se nachází sekvence, na kterou se váží adaptéry membránového cytoskeletu, které určují místo a funkci různých proteinů v blízkosti aktinového cytoskeletu (Voltz et al., 2001). Vazbou na CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) obnovuje NHERF-1 jeho množství v plazmatické membráně (Cheng et al., 2004) a tím hraje nezanedbatelnou roli v buněčné polaritě a signalizaci (Kalyoncu et al., 2010). Prostřednictvím obou PDZ domén, které několika způsoby ovlivňují buňku, se NHERF-1 podílí na karcinogenezi. PDZ1 doména je důležitá pro expresi proteinu NHERF-1, který se podílí na ztrátě invazivního růstu (Cardone et al., 2012). Podle studií Accardiho a kolektivu (2011) je E6 HPV-16 schopen navázat se prostřednictvím PBM na PDZ doménu NHERF-1 a spolu s E7 indukovat jeho degradaci. Je zajímavé, že PBM E6 HPV-18 není schopen vyvolat degradaci NHERF-1. Důvodem může být vysoká specifita PDZ domény ve výběru jejích interagujících PBM.

5.1.5 PBM E6 a CAL

CAL, (*CFTR-associated ligand*), je 454 aminokyselin dlouhý proteinový ligand asociovaný s chloridovým kanálem, který reguluje transport Cl^- iontů přes buněčnou membránu. Obsahuje 2 strukturální motivy „*coiled-coil*“, což jsou 2 a více α -helixů obtočených kolem sebe do jedné spirály, a 1 PDZ doménu, kterou se může vázat na CFTR nebo jiné buněčné proteiny. Bylo zjištěno, že vyšší exprese CAL je schopna snížit expresi CFTR a tím v savcích buňkách redukovat transport chloridových iontů. Tento efekt může být překonán pomocí NHERF, který obnovuje expresi CFTR. CAL se také podílí na vezikulárním transportu mezi membránovými organelami (Cheng et al. 2004). Podle studií Jeonga a kolektivu (2007) se E6 HPV-16 váže na CAL *in vivo* a podporuje jeho degradaci prostřednictvím ubiquitinové proteazomální dráhy spojené s E6-AP. Samotný E6-AP je také schopen navázat se na CAL prostřednictvím „*coiled-coil*“ domény a regulovat jeho funkce a množství v buňce. Interakce E6 s CAL nebyla pozorována u nízko rizikových HPV-6 a HPV-11. Také u HPV-18 byla vazba na CAL kvůli jiné aminokyselinové sekvenci na PBM mnohem slabší. Zdá se tedy, že za normálních podmínek se na CAL váže E6-AP. V buňkách infikovaných HPV-16 se ale na CAL váže

E6 prostřednictvím PBM a ten následně rekrutuje E6-AP, čímž je urychlena degradace CAL. To se může projevit deregulací buněčného prostředí v důsledku absence CAL, který se uplatňuje ve vezikulárním transportu.

5.1.6 PBM E6 a GIPC

Buněčný protein GIPC (*GAIP-interacting protein, C terminus*) interaguje s proteinem GAIP (*GTPase-activating protein for Gai subunit*), který se vyskytuje v membráně klatrinových váčků. GIPC interaguje s C'-koncem GAIP a má centrální PDZ doménu (de Vries et al., 1998). GIPC protein může interagovat s PBM E6 vysoce rizikových HPV, ale tato interakce závisí na aminokyselinové sekvenci PBM E6. V případě záměny aminokyseliny z PBM E6 HPV-18 nejsou schopny proteiny E6 a GIPC vytvořit komplex. Pokud však tento komplex utvoří, spouští E6 polyubiquitinaci GIPC proteinu a jeho následnou proteazomální degradaci prostřednictvím E6-AP. Pokles buněčného GIPC urychluje buněčné dělení a inhibuje expresi DNA vazebného proteinového inhibitoru zvaného Id3, který je nutný pro plně funkční TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β -1). TGF- β 1 je uplatňován v kontrole buněčného růstu a buněčného dělení. Pokles GIPC navíc způsobuje, že jsou infikované buňky méně citlivé k cytostatickému účinku TGF- β 1 (Favre-Bonvin et al., 2005).

5.1.7 PBM E6 a PTPN13

PTPN13 je 270kDa protein, je členem nonreceptorových fosfatáz, obsahuje 5 různých PDZ-vazebných domén a je důležitý pro přežití buněk – hraje roli jako tumor supresor. Podle studií autorů Spanos a kolektiv (2008) se PBM E6 HPV-16 váže na buněčnou fosfatázu PTPN13 a zpětnovazebně snižuje její expresi. Tento úbytek proteinu PTPN13 indukuje u infikovaných buněk schopnost růst v tekutém agaru, ale pokud je jeho exprese znovuobnovena do původních hodnot, je invazivní růst omezen nebo zablokován. Při zmiňovaných experimentech v myších epiteliálních buňkách mandlí (MTEC) se také ukázalo, že tento efekt je vázán na nemutovanou formu E6, kdežto E6 s deletovanou PBM (E6 $_{\Delta 146-151}$) nedokáže invazivní růst indukovat. Dalším zjištěním bylo, že přidáním onkoproteinu Ras^{V12} k buňkám exprimujícím E6 s E7 a k buňkám produkujícím pouze E6 se podpoří invazivní tumorogenní růst. Pro porovnání, buňky s E6 $_{\Delta 146-151}$ a Ras^{V12} a buňky se samotným onkoproteinem Ras^{V12} tento růst nevykazovaly. Tato data ukazují, že invazivní růst živých buněk je závislý na mechanismu asociovaným s PBM E6.

5.1.8 PBM E6 a NF- κ B

PBM E6 HPV-16 je schopna aktivovat transkripci genů zprostředkovanou NF- κ B. Transkripční faktor NF- κ B je heterodimer složený z p50 a RelA (p65) proteinů nebo z p52 a RelB proteinů, kde Rel proteiny obsahují jaderný lokalizační signál. NF- κ B je exprimovaný ve většině lidských buněk, ale je inaktivovaný a udržovaný v cytoplazmě pomocí svého inhibitoru I κ B- α . Degradací inhibitoru I κ B- α se aktivuje NF- κ B, přemístí se do jádra a tam aktivuje expresi různých genů, které mají vliv na buněčný růst, diferenciaci, zánětlivou reakci a regulaci apoptózy (Lessard et al., 2003). Aktivace NF- κ B souvisí

s několika typy nádorů jako rakovina prsu (Helbig et al., 2003) nebo rakovina prostaty (Lessard et al., 2003). PBM E6 HPV-16 je také schopna navázat složku NF- κ B na promotor cIAP-2 a zvýšit jeho expresi. cIAP-2 je silný antiapoptický faktor a jeho pokles je dostačující pro vyvolání apoptózy. Zvýšením jeho exprese prostřednictvím NF- κ B znemožní buňce vyvolat apoptózu. Dále může PBM E6 odvrátit buněčnou apoptózu zabráněním aktivace apoptické kaspázy 3 vyvolané TNF- α (*Tumor Necrosis Factor – α*) (James et al., 2006). Množství exprimovaných E6 v hostitelské buňce však může ovlivnit citlivost buňky k TNF. Malé množství E6 může ochránit buňku před TNF, kdežto velké množství E6 způsobí mnohem větší citlivost buněk k TNF a tím ovlivní jejich životaschopnost (Filippova et al., 2005).

Interakce E6 a NF- κ B zprostředkovaná PBM je tedy schopna ochránit buňku před indukcí apoptózy, a to způsobem nezávislým na degradaci buněčného proteinu p53 a aktivaci hTERT.

5.1.9 PBM E6 a Wnt/ β -cateninová dráha

Wnt (z anglického *Wingless/Integration-1*) signalizační dráha je spojena s regulací proteinu β -catenin, který je jedním z proteinů regulujících buněčné adhezní spoje. Pokud nejsou přítomny Wnt ligandy, indukuje to tvorbu komplexu, který fosforyluje a degraduje β -catenin. Pokud je Wnt signalizační dráha aktivována, pak ovlivněním jiných buněčných proteinů zabraňuje tvorbě tohoto degradačního komplexu a β -catenin je translokován do buněčného jádra, kde se kumuluje (MacDonald et al., 2009). V jádře se β -catenin naváže na transkripční faktor TCF4 (z anglického *T-cell factor 4*) a kontroluje expresi několika genů uplatňujících se v regulaci buněčné polarity, proliferace a diferenciaci (Clevers, 2006). Bylo zjištěno, že v jádrech buněk cervikálního karcinomu způsobeného HPV-16, se běžně vyskytuje β -catenin, kdežto u časných lézí byl tento výskyt vzácný (Üren et al., 2005).

Podle studií Bonilla-Delgado a kolektivu z roku 2012 se u osmidenních transgenních myší, které exprimovaly v kožním epitelu E6 s PBM z HPV-16, v buněčném jádře žádný β -catenin nevyskytoval. Ve věku 4 měsíců byl znatelný nárůst jaderného β -catenin a nejvíce detekovatelné množství vykazovaly myši ve stáří 1 roku. V myších, které exprimovaly E6 deletovaný o PBM, nebyl tento nárůst zdaleka tak znatelný. Také se ukázalo, že PBM je nutná pro udržení proliferace buněk vyšších epidermálních vrstev u dospělých myší. Při testování indukce Wnt signální dráhy *in vitro* však byly pozorovány jiné výsledky. Ukázalo se, že indukce této signální dráhy E6 proteinem nebyla závislá na přítomnosti PBM. Tyto odlišné závěry naznačují, že interakce E6 a Wnt signální dráhy je složitá a může být závislá na jiných signálních drahách a také na stáří infikovaného jedince.

5.2 Další funkce PBM

Málo rizikové i vysoce rizikové HPV jsou schopny se svými E6 onkoproteiny vázat na buněčné proteiny obsahující LXXLL sekvenci. LXXLL motiv je amfipatická šroubovice bohatá na leucin, která

se nachází i na E6-AP a jejím prostřednictvím se na něj váže protein E6. Vazba mezi E6-AP a E6 podporuje hostitelskou translaci závislou na čepičce. Tato translace začíná rozpoznáním 7-metyl-G(5')ppp(5')N čepičky eukaryotickým iniciačním faktorem eIF4F (Marcotrigiano et al., 1999). Exprese E6 HPV-16 zvyšuje proteinovou syntézu posílením sestavování translační iniciační čepičky (Spangle a Münger, 2010). Podle výsledku výzkumu autorů Spangle a kolektiv (2012) jsou slizniční málo rizikové HPV i vysoce rizikové HPV schopny zvýšit pomocí svého E6 proteinu translaci závislou na čepičce, ale vysoce rizikové HPV jsou díky své PBM v tomto ohledu mnohem efektivnější. Tímto bylo poukázáno na roli PBM v E6, která se podílí spolu s LXXLL motivem na zvýšení aktivity buněčné translace nezávisle na E7 proteinu (Klingelutz a Roman, 2012). Tato translace může být důležitá pro životní cyklus HPV ve specifickém tkáňovém epitelu.

Práce autorů Nicolaides a kolektiv z roku 2011 naznačuje, že interakce E6 PBM spolu s buněčnými PDZ proteiny hScrib, hDlg nebo MAGI-1 zvyšuje stabilitu samotného E6 onkoproteinu a může ovlivnit i jeho množství v infikované buňce. Zatím není známo, jak je této stability dosaženo, ale je pravděpodobné, že to bude souviset se stabilitou E6 v přítomnosti nebo při absenci PBM. Je totiž zajímavé, že oproti divokému typu (z anglického *wild-type*, zkráceně *wt*) vysoce rizikového HPV je virus s mutovaným E6 v PDZ doméně udržován v hostitelské buňce v nižším počtu kopií (Lee a Laimins, 2004). Mutanty genomů HPV-16 zbavené své PBM na C'-koncích E6 totiž nebyly v buňkách udrženy, zatímco genomy E6 s PBM byly z velké části zachovány v podobě epizomů. E6 je potřebný pro údržbu virových epizomů (Park a Androphy, 2002), kdežto mutanty E6 zkrácené o PBM nebyly schopny vydržet v epizomech a integrovaly se do buněčné DNA. Bylo také prokázáno, že PBM *wt*-E6 účinně ochraňuje tento virový onkoprotein před proteazomální degradací (Nicolaides et al., 2011). Další zajímavostí je, že byla také zjištěna nižší míra růstu hostitelských keratinocytů v přítomnosti E6 zbaveného o PBM (Lee a Laimins, 2004).

6 Závěr

Lidské papillomaviry způsobují řadu lidských nádorů. Mezi takzvaně vysoce rizikové je v tomto ohledu řazeno celkem 15 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82). Jejich regulační proteiny E6 obsahují tzv. PDZ-vazebnou doménu a bylo objeveno několik buněčných proteinů, které prostřednictvím své PDZ domény interagují s proteinem E6 vysoce rizikových HPV. Některé jsou součástí mezibuněčných spojů, důležitých regulačních nebo signálních buněčných drah, některé se podílejí na kontrole buněčné polarity. V afinitě k PDZ proteinům existují mezi E6 proteiny jednotlivých vysoce rizikových HPV podstatné rozdíly. Jako první se nabízí rozdílnost v aminokyselinové sekvenci PBM na C'-konci E6. I malá jedno-aminokyselinová rozdílnost v PBM E6 mezi HPV-16 a HPV-18 má vliv na sílu vazby proteinů hDlg a hScrib (Thomas et al., 2005). A tak, i když se výčet všech interakčních partnerů zdá být vysoký, je pravděpodobné, že E6 každého HPV interaguje díky své specifické PBM pouze s omezeným množstvím buněčných PDZ proteinů, které

nejlépe odpovídají aminokyselinovým požadavkům dané PBM (Pim et al., 2012). Je pozoruhodné, že v nádorových buňkách, ve kterých je exprimováno velké množství E6 onkoproteinu, jsou buněčné proteiny obsahující PDZ doménu degradovány (hDlg, hScrib, MAGI-1, GIPC). Tato degradace však nebyla prokázána, pokud byly E6 exprimovány v nižším množství typickém pro produktivní infekci (Nicolaidis et al., 2011). Navíc se ukázalo, že i E6 z nízko rizikového HPV-70, který je schopený imortalizovat normální keratinocyty předkožky prostřednictvím spolupráce E6 a E7 proteinů stejně efektivně, jako vysoce rizikové HPV, může interagovat s MAGI-1 a hDlg a degradovat je (Muench et al., 2009). Svou roli v nejednoznačnosti interpretací může hrát i fakt, že některé interakce mezi buněčnými proteiny a PBM E6 jsou zjišťovány pouze experimentálně *in vitro*, kdežto v organismu hostitele budou pravděpodobně působit i jiné kofaktory, které mohou ovlivnit potenciální vývoj nádoru. Kromě toho, epitelální vrstva není neměnná, stále se vyvíjí. Je možné, že některé interakce mezi PBM E6 a PDZ proteiny vyžadují různé fáze virového životního cyklu (Pim et al., 2012). Jedním z hlavních cílů v problematice PBM E6 a PDZ proteinů je tedy snaha zjistit, zda se vysoce rizikové HPV snaží interakci s PDZ proteiny, které se podílejí na buněčné polaritě, navodit vhodné prostředí, které by přispívalo k udržování virového genomu v hostitelské buňce. Zároveň je třeba brát v potaz i fakt, že PBM neovlivňuje pouze buněčné proteiny. Ukázalo se, že má roli i ve stabilizaci samotného E6 onkoproteinu a podílí se také na množství E6 v infikované buňce prostřednictvím interakce s PDZ proteiny. E6 s deletovanou PBM, které nejsou schopny se navázat na PDZ proteiny a fenotypově odpovídají nízko rizikovým HPV, jsou méně stabilní, a tudíž se jich nachází v buňce méně. Tento poznatek se shoduje i s tvrzením, že většina HPV způsobujících pouze benigní bradavice a léze, exprimuje E6 v nižším množství potřebným pouze pro produktivní infekci.

Jakou roli však hraje PDZ-vazebná doména E6 proteinů vysoce rizikových HPV při nádorové transformaci? Všechny HPV, které jsou schopny vyvolat cervikální karcinom, imortalizují hostitelskou buňku vazbou E6-AP s proteinem p53, který degradují. Zdá se, že pro maligní vývoj je potřeba tato imortalizace hostitelské buňky (Muench et al., 2009) a vysoce rizikové HPV využívají PBM především pro urychlení tempa růstu infikovaných buněk regulací PDZ buněčných proteinů (Spanos et al., 2008). Vazba jednotlivých proteinů s PBM E6 však může mít rozdílný vliv na rozvoj zhoubných nádorů. Proto by poznatky o struktuře a interakcích PBM mohly mít zásadní prognostický charakter při léčbě nádorů způsobených HPV a zásadně přispět k vývoji nových terapeutických postupů.

7 Literatura

Accardi R., Rubino R., Scalise M., Gheit T., Shahzad N., Thomas M., Banks L., Indiveri C., Sylla B. S., Cardone R. A., Reshkin S. J. and Tommasino M. (2011) E6 and E7 from Human Papillomavirus Type 16 Cooperate To Target the PDZ Protein Na/H Exchange Regulatory Factor 1. *Journal of Virology* 85, 8208 – 8216

- Bernard H.-U. (2004) The Clinical Importance of the Nomenclature, Evolution and Taxonomy of Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology* 32S, S1 – S6
- Bernard H.-U., Burk R. D., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villers E.-M. (2010) Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology* 401, 70 – 79
- Bodily J. and Laimins L. A. (2011) Persistence of Human Papillomavirus Infection: Keys to Malignant Progression. *Trends in Microbiology* 19, 33 – 39
- Bonilla-Delgado J., Bulut G., Liu X, Cortés-Malagón E. M., Schlegel R., Flores-Maldonado C., Contreras R. G., Chung S. H., Lambert P. F., Uren A. and Gariglio P. (2012) The E6 Oncoprotein from HPV16 Enhances the Canonical Wnt/ β -Catenin Pathway in Skin Epidermis *In Vivo*. *Molecular Cancer Research* 10, 250 – 258
- Cardone R. A., Greco M. R., Capulli M., Weinman E. J., Busco G., Bellizzi A., Casavola V., Antelmi E., Ambruosi B., Dell'Aquila M. E., Paradiso A., Teti A., Rucci N. and Reshkin S. J. (2012) NHERF1 Acts As a Molecular Switch to Program Metastatic Behavior and Organotropism Via Its PDZ Domains. *Molecular Biology of the Cell* 23, 2028 – 2040
- Chen Z., Schiffman M., Herrero R., DeSalle R. and Burk R. D. (2007) Human Papillomavirus (HPV) Types 101 and 103 Isolated from Cervicovaginal Cells Lack an E6 Open Reading Frame (ORF) and are Related to Gamma-Papillomaviruses. *Virology* 360, 447 – 453
- Cheng J., Wang H. and Guggino W. B. (2004) Modulation of Mature Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Protein by the PDZ Domain Protein CAL. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 1892 – 1898
- Clevers Hans (2006) Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469 – 480
- de Villers E.-M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H.-U. and zur Hausen H. (2004) Classification of Pappilomaviruses. *Virology* 324, 17 – 27
- de Vries L., Lou X., Zhao G. Zheng B. and Farquhar M. G. (1998) GIPC, a PDZ Domain Containg Protein, Interacts Specifically with the C Terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12340 – 12345
- Dow L. E., Brumby A. M., Muratore R., Coombe M. L., Sedelies K. A., Trapani J. A., Russell S. M., Richardson H. E. and Humbert P. O. (2003) hScrib Is a Functional Homologue of the Drosophila Tumour Suppressor Scribble. *Oncogene* 22, 9225 – 9230

Duensing A., Liu Y., Tseng M., Malumbres M., Barbacid M. and Duensing S. (2006) Cyclin-Dependent Kinase 2 is Dispensable for Normal Centrosome Duplication but Required for Oncogene-Induced Centrosome Overduplication. *Oncogene* 25, 2943 – 2949

Duensing S., Lee L. Y., Duensing A., Basile J., Piboonniyom S.-O., Gonzalez S., Crum C. P. and Münger K. (2000) The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Cooperate to Induce Mitotic Defects and Genomic Instability by Uncoupling Centrosome Duplication from the Cell Division Cycle. *Proc Natl Acad U S A* 97, 10002 – 10007

Favre-Bonvin A., Reynaud C., Kretz-Remy C. and Jalinot P. (2005) Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein Binds the Cellular PDZ Protein TIP-2/GIPC, Which Is Involved in Transforming Growth Factor β Signaling and Triggers Its Degradation by the Proteasome. *Journal of Virology* 79, 4229 – 4237

Filippova M., Brown-Bryan T. A., Casiano C. A and Duerksen-Hughes P. J. (2005) The Human Papillomavirus 16 E6 Protein Can Either Protect Or Further Sensitize Cells To TNF: Effect of Dose. *Cell Death and Differentiation* 12, 1622 – 1635

Gaiffe E., Pr  tet J.-L., Launay S., Jacquin E., Saunier M., Hetzel G., Oudet P. and Mougin C. (2012) Apoptotic HPV Positive Cancer Cells Exhibit Transforming Properties. *PLoS ONE* 7(5): e36766. doi:10.1371/journal.pone.0036766

Gaston K. Small DNA Tumour Viruses. 1st edition. Caister Academic Press, Great Britain, 2012, ISBN 978-1-904455-99-8

Glaunsinger B. A., Lee S. S., Thomas M., Banks L. and Javier R. (2000) Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with Adenovirus E4-ORF1 and High-Risk Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Oncogene* 19, 5270 – 5280

Handa K., Yugawa T., Narisawa-Saito M., Ohno S.-I., Fujita M. and Kiyono T. (2007) E6AP-Dependent Degradation of DLG4/PSD95 by High-Risk Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein. *Journal of Virology* 81, 1379 – 1389

Hariri S., Unger E. R., Sternberg M., Dunne E. F., Swan D., Patel S. and Markowitz L. E. (2011) Prevalence of Genital Human Papillomavirus among Females in the United States, the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003 – 2006. *Journal of Infectious Diseases* 204, 566 – 573

Harry J. B. and Wettstein F. O. (1996) Transforming Properties of the Cottontail Rabbit Papillomavirus Oncoproteins LE6 and SE6 and of the E8 Protein. *Journal of Virology* 70, 3355 – 3362

- Helbig G., Christopherson K. V. 2nd, Bhat-Nakshatri P., Kumar S., Kishimoto H., Miller K. D., Broxmeyer H. E. and Nakshatri H. (2003) NF-kappaB Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing The Expression of The Chemokine Receptor CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 21631 – 21638
- Holmgren S. C., Patterson N. A., Ozbun M. A. and Lambert P. F. (2005) The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle. *Journal of Virology* 79, 3938 – 3948
- Hung A. Y. and Sheng M. (2002) PDZ domains: Structural Modules for Protein Complex Assembly. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 5699 – 5702
- James M. A., Lee J. H. and Klingelutz A. J. (2006) Human Papillomavirus Type 16 E6 Activates NF- κ B, Induces CIA-2 Expression, and Protects against Apoptosis in a PDZ Binding Motif-Dependent Manner. *Journal of Virology* 80, 5301 – 5307
- Javier R. T. and Rice A. P. (2011) Emerging Theme: Cellular PDZ Proteins as Common Targets of Pathogenic Viruses. *Journal of Virology* 85, 11544 – 11556
- Jeleń F., Oleksy A., Śmietana K. and Otlewski J. (2003) PDZ Domains – Common Players in the Cell Signaling. *Acta Biochimica Polonica* 50, 985 – 1017
- Jeong K. W., Kim H.-Z., Kim S., Kim Y. S. and Choe J. (2007) Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Interacts With Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator-Associated Ligand and Promotes E6-Associated Protein-Mediated Ubiquitination and Proteasomal Degradation. *Oncogene* 26, 487 – 499
- Kalyoncu S., Keskin O. and Gursoy A. (2010) Interaction Prediction and Classification of PDZ Domains. *BMC Bioinformatics* 11
- Kessis T. D., Connolly D. C., Hedrick L. and Cho K. R. (1996) Expression of HPV16 E6 or E7 Increases Integration of Foreign DNA. *Oncogene* 13, 427 – 431
- Kiyono T., Hiraiwa A., Fujita M., Hayashi Y., Akiyama T. and Ishibashi M. (1997) Binding of High-Risk Human Papillomavirus E6 Oncoproteins to the Human Homologue of the Drosophila Discs Large Tumor Suppressor Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11612 – 11616
- Klingelutz A. J. and Roman A. (2012) Cellular Transformation by Human Papillomaviruses: Lessons Learned by Comparing High- and Low-Risk Viruses. *Virology* 424, 77 – 98
- Korzeniewski N., Spardy N., Duensing A. and Duensing S. (2011) Genomic Instability and Cancer: Lessons Learned from Human Papillomaviruses. *Cancer Letters* 305, 113 – 122

- Kranjec C. and Banks L. (2011) A Systematic Analysis of Human Papillomavirus (HPV) E6 PDZ Substrates Identifies MAGI-1 as a Major Target of HPV Type 16 (HPV-16) and HPV-18 Whose Loss Accompanies Disruption of Tight Junctions. *Journal of Virology* 85, 1757 – 1764
- Lazić D., Hufbauer M., Zigrino P., Buchholz S., Kazem S., Feltkamp M. C. W., Mauch C., Steger G., Pfister H. and Akgül B. (2012) Human Papillomavirus Type 8 E6 Oncoprotein Inhibits Transcription of the PDZ Protein Syntenin-2. *Journal of Virology* 86, 7943 – 7952
- Lee C. and Laimins L. A. (2004) Role of the PDZ Domain-Binding Motif of the Oncoprotein E6 in the Pathogenesis of Human Papillomavirus Type 31. *Journal of Virology* 78, 12366 – 12377
- Lee H.-J. and Zheng J. J. (2010) PDZ Domains and Their Binding Partners: Structure, Specificity, and Modification. *Cell Communication and Signaling* 8
- Leong C. M., Doorbar J., Nindl I., Yoon H.-S. and Himba M. H. (2010) Loss of Epidermal Langerhans Cells Occurs in Human Papillomavirus α , γ and μ but Not β Genus Infections. *Journal of Investigative Dermatology* 130, 472 – 480
- Lessard L., Mes-Masson A.-M., Lamarre L., Wall L., Lattouf J.-B. and Saad F. (2003) NF- κ B Nuclear Localization and Its Prognostic Significance In Prostate Cancer. *BJU International* 91, 417 – 420
- MacDonald B. T., Tamai K. and He X. (2009) Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* 17, 9 – 26
- Marcotrigiano J., Gingras A.-C., Sonenberg N. and Burley S. K. (1999) Cap-Dependent Translation Initiation in Eukaryotes Is Regulated by a Molecular Mimic of eIF4G. *Molecular Cell* 3, 707 – 716
- Massimi P., Gammoh N., Thomas M. and Banks L. (2004) HPV E6 Specifically Targets Different Cellular Pools of Its PDZ Domain-Containing Tumour Suppressor Substrates for Proteasome-Mediated Degradation. *Oncogene* 23, 8033 – 8039
- Moody C. A. and Laimins L. A. (2010) Human Papillomavirus Oncoproteins: Pathways to Transformation. *Nature Reviews Cancer* 10, 550 – 560
- Muench P., Hiller T., Probst S., Florea A.-M., Stubenrauch F. and Iftner T. (2009) Binding of PDZ proteins to HPV E6 Proteins Does Neither Correlate with Epidemiological Risk Classification Nor with the Immortalization of Foreskin Keratinocytes. *Virology* 387, 380 – 387
- Muñoz N., Bosch F. X., Sanjose S., Herrero R., Castellsague R., Shah K. V., Snijders P. J. F. and Meijer C. J. L. M. (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine* 348, 518 – 527

- Münger K., Baldwin A., Edwards K. M., Hayakawa H., Nguyen C. L., Owens M., Grace M. and Huh K. (2004) Mechanism of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology* 78, 11451 – 11460
- Nakagawa S. and Huibregtse J. M. (2000) Human Scribble (Vartul) Is Targeted for Ubiquitin-Mediated Degradation by the High-Risk Papillomavirus E6 Proteins and the E6AP Ubiquitin-Protein Ligase. *Molecular and Cellular Biology* 20, 8244 – 8253
- Narayan N., Subbaiah V. K. and Banks L. (2009) The High-Risk HPV E6 Oncoprotein Preferentially Targets Phosphorylated Nuclear Forms of hDlg. *Virology* 387, 1 – 4
- Nicolaides L., Davy C., Raj K., Kranjec C., Banks L. and Doorbar J. (2011) Stabilization of HPV16 E6 Protein by PDZ Proteins, and Potential Implications for Genome Maintenance. *Virology* 414, 137 – 145
- O'Brien V., Ashrafi G. H., Grindlay G. J., Anderson R. and Campo M. S. (1998) A Mutational Analysis of the Transforming Functions of the E8 Protein of Bovine Papillomavirus Type 4. *Virology* 255, 385 – 394
- Oh S. T., Kyo S. and Laimins L. A. (2001) Telomerase Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein: Induction of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression Through Myc and GC-Rich Sp1 Binding Sites. *Journal of Virology* 75, 5559 – 5566
- Park R. B. and Androphy E. J. (2002) Genetic Analysis of High-Risk E6 in Episomal Maintenance of Human Papillomavirus Genomes in Primary Human Keratinocytes. *Journal of Virology* 76, 11359 – 11364
- Pim D. and Banks L. (2010) Interaction of Viral Oncoproteins with Cellular Target Molecules: Infection with High-risk vs Low-risk Human Papillomaviruses. *Journal Compilation AMPIS* (118), 471 – 493
- Pim D., Bergant M., Boon S. S., Ganti K., Kranjec C., Massimi P., Subbaiah V. K., Thomas M., Tomaic V. and Banks L. (2012) Human Papillomaviruses and the Specificity of PDZ Domain Targeting. *FEBS Journal Accepted Article*; doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08709.x
- Pim D., Tomaic V. and Banks L. (2009) The Human Papillomavirus (HPV) E6* Proteins from High-Risk, Mucosal HPVs Can Direct Degradation of Cellular Proteins in the Absence of Full-Length E6 Protein. *Journal of Virology* 83, 9863 – 9874

- Spangle J. M, Ghosh-Choudhury N. and Münger K. (2012) Activation of Cap-Dependent Translation by Mucosal Human Papillomavirus E6 Proteins Is Dependent on the LXXLL Binding Motif. *Journal of Virology* 86, 7466 – 7472
- Spangle J. M. and Münger K. (2010) The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Activates mTORC1 Signaling and Increases Protein Synthesis. *Journal of Virology* 84, 9398 – 9407
- Spanos W. C., Geiger J., Anderson M. E., Harris G. F., Bossler A. D., Smith R. B., Klingelutz A. J. and Lee J. H. (2008) Deletion of the PDZ Motif of HPV16 E6 Preventing Immortalization and Anchorage-Independent Growth in Human Tonsil Epithelial Cells. *Head and Neck* 30, 139 – 147
- Spanos W. C., Hoover A., Harris G. F., Wu S., Strand G. L., Anderson M. E., Klingelutz A. J., Hendriks W., Bossler A. D. and Lee J. H. (2008) The PDZ Binding Motif of Human Papillomavirus Type 16 E6 Induces PTPN13 Loss, Which Allows Anchorage-Independent Growth and Synergizes with Ras for Invasive Growth. *Journal of Virology* 82, 2493 – 2500
- Spardy N., Duensing A., Charles D., Haines N., Nakahara T., Lambert P. F. and Duensing S. (2007) The Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Activates the Fanconi Anemia (FA) Pathway and Causes Accelerated Chromosomal Instability in FA Cells. *Journal of Virology* 81, 13265 – 13270
- Stubenrauch F., Hummel M., Iftner T. and Laimins L. A. (2000) The E8^{E2C} Protein, a Negative Regulator of Viral Transcription and Replication, Is Required for Extrachromosomal Maintenance of Human Papillomavirus Type 31 in Keratinocytes. *Journal of Virology* 74, 1178 – 1186
- Subbaiah V. K., Massimi P., Boon S. S., Myers M. P., Sharek L., Garcia-Mata R. and Banks L. (2012) The Invasive Capacity of HPV Transformed Cells Requires the hDlg-Dependent Enhancement of SGEF/RhoG Activity. *PLoS Pathogens* 8(2): e1002543. doi:10.1371/journal.ppat.1002543
- Thomas M., Massimi P., Navarro C., Borg J.-P. and Banks L. (2005) The hScrib/Dlg Apico-Basal Control Complex Is Differentially Targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 Proteins. *Oncogene* 24, 6222 – 6230
- Üren A., Fallen S., Yuan H, Usubütün A., Küçükali T., Schlegel R. and Toretsky J. A. (2005) Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression. *Cancer Research* 65, 6199 – 6206
- Venuti A., Paolini F., Nasir L., Corteggio A., Roperto S., Campo M. S. and Borzacchiello G. (2011) Papillomavirus E5: the Smallest Oncoprotein with Many Functions. *Molecular Cancer* 10
- Voltz J. W., Weinman E. J. and Shenolikar S. (2001) Expanding the Role of NHERF, a PDZ-Domain Containing Protein Adapter, To Growth Regulation. *Oncogene* 20, 6309 – 6314

Wang C. K., Pan L., Chen J. and Zhang M. (2010) Extensions of PDZ Domains as Important Structural and Functional Elements. *Protein Cell* 1, 737 – 751

Wentzensen N., Vinokurova S. and von Knebel Doeberitz M. (2004) Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dysplasia and Invasive Cancer of the Female Lower Genital Tract. *Cancer Research* 64, 3878 – 3884

White E. A., Sowa M. E., Tan M. J. A., Jeudy S., Hayes S. D., Santha S., Münger K., Harper J. W. and Howley P. M. (2011) Systematic Identification of Interactions Between Host Cell Proteins and E7 Oncoproteins From Diverse Human Papillomaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E260 – E267

WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Czech Republic. Summary Report 2010. [12. 7. 2012]. Available at www.who.int/hpvcentre

WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report 2010. [12. 7. 2012]. Available at www.who.int/hpvcentre

Zhu X., Yang N., Cai J., Yang G., Liang S. and Ren D. (2010) The Intrabody Targeting of hTERT Attenuates the Immortality of Cancer Cells. *Cellular and Molecular Biology Letters* 15, 32 – 45

zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application. *Nature Reviews Cancer* 2, 342 – 350